

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
17 juillet 2003 (17.07.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2003/058244 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

G01N 33/543

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/000069

(22) Date de dépôt international :

10 janvier 2003 (10.01.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/00294

11 janvier 2002 (11.01.2002)

FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
BIOMEDICAL DIAGNOSTIC SA [FR/FR]; SA direc-  
toire & c. surveillance, Boulevard de Beaubourg, F-77183  
Croissy Beaubourg (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : LAROCHE,  
Pascale [FR/FR]; 14, rue des Meuniers, F-75012 Paris  
(FR).

(74) Mandataire : SAUVAGE, Renée; Cabinet Sauvage, 65,  
boulevard Soult, F-75012 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR),  
brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale:

11 mars 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING A CALIBRATION SYSTEM

(54) Titre : PROCEDE D'OBTENTION D'UN SYSTEME D'ETALONNAGE

(57) Abstract: The invention uses different categories of particles, each of which is sensitized by a specific ligand for one of the analytes to be dosed. An immunological reagent consisting of a mixture of each of said particle categories having been sensitized by a specific quantity of the respective ligand is prepared. The signals resulting from the interaction between said immunological reagent and the biological sample on one hand and a calibration standard on the other are then measured. A correction factor is subsequently determined which is applied to the different resulting signals in such a way that each analyte of the sample can be titrated in biological units.

(57) Abrégé : L'invention utilise différentes catégories de particules sensibilisées, chacune, par un ligand spécifique de l'un des analytes à doser. On prépare un réactif immunologique constitué par un mélange de chacune desdites catégories de particules respectivement sensibilisées par une quantité sélectionnée de ligand, mesure les signaux résultants de l'interaction entre ledit réactif immunologique et, d'une part, l'échantillon biologique, d'autre part, un standard d'étalonnage, détermine un facteur de correction à appliquer aux différents signaux résultants de manière à obtenir la titration, en unités biologiques, de chaque analyte de l'échantillon.

WO 2003/058244 A3

10/500563

Procédé d'obtention d'un système d'étalonnage unique appliqué aux dosages multiparamétriques d'échantillons biologiques, réactif immunologique préparé à cette fin et procédé de dosage.

5

La présente invention concerne, d'une manière générale, le domaine des dosages d'analytes à partir d'échantillons biologiques et, plus particulièrement l'étalonnage de tels procédés de dosage. De manière  
10 spécifique, la présente invention a pour objet un nouveau procédé d'obtention d'un système d'étalonnage unique, permettant de quantifier simultanément plusieurs analytes, quel que soit leur nombre et dans un même milieu réactionnel.

15 Par système d'étalonnage "unique", on entend un seul système quel que soit le nombre d'analytes recherchés simultanément.

La quantification des analytes compris dans un échantillon biologique étant devenue indispensable tant au  
20 niveau de la recherche que de la médecine classique, celle-ci a fait l'objet de nombreux développements visant non seulement à améliorer la fiabilité et la reproductibilité des dosages, mais également à en diminuer les coûts.

25 Les techniques classiques consistent à doser chaque analyte séparément et, pour ce faire, à réaliser pour chacun desdits analytes un étalonnage propre du système utilisé. Il en résulte un grand nombre de manipulations et une consommation importante en réactifs, ce qui a pour  
30 conséquence un prix relativement élevé.

Si une telle manière d'opérer reste envisageable dans le contexte de la recherche où la quantité de paramètres à doser est limitée et ciblée, elle pose un sérieux problème de coût dans le contexte de la médecine, où, en  
35 laboratoires d'analyse, l'on cherche à doser rapidement un grand nombre d'analytes.

Il a récemment été décrit, notamment dans les demandes de brevet internationales WO 99/36564 et WO 97/14028, une technique permettant de quantifier, de façon précise et reproductible, plusieurs analytes en un seul et même dosage à partir du même échantillon. Cette technique repose sur l'utilisation de différentes catégories de particules fluorescentes, chaque catégorie de particules étant sensibilisée par des ligands ayant des propriétés différentes, lesdits ligands étant adaptés à se lier de façon directe ou indirecte aux analytes et consistant généralement en des anticorps ou des antigènes. La quantification de la réaction entre ligand et analytes est réalisée par l'intermédiaire d'un composé fluorescent de longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes de celles des particules fluorescentes.

Ainsi, une simple lecture par cytométrie en flux permet de quantifier la réaction associée à chaque catégorie de particules et donc de déduire de ladite quantification les quantités des différents analytes présents dans un même échantillon.

Cependant, cette quantification nécessite au préalable la construction d'autant de systèmes d'étalonnage que d'analytes à doser, c'est-à-dire de réaliser  $X \times Y$  dosages réservés à l'étalonnage,  $X$  étant le nombre d'analytes à doser simultanément (ou le nombre de particules sensibilisées par des ligands ayant des propriétés différentes) et  $Y$  le nombre de points d'étalonnage. Cette méthode entraîne donc non seulement un surcoût de la manipulation, mais également un problème de gestion pratique, du fait de l'encombrement des puits des micro-plaques de titration, (les tests étant généralement réalisés sur des plaques de micro-titration ELISA de 96 puits), ainsi qu'une augmentation de la durée de la manipulation.

Par exemple, pour le dosage simultané de 10 analytes, ce système implique la constitution de 10 systèmes d'étalonnage différents, soit pour 100 échantillons testés,

une consommation supplémentaire en réactifs allant de 10 à 40% selon le nombre de points d'étalonnage, et un problème évident d'encombrement.

La présente invention vise à remédier aux  
5 inconvénients de l'art antérieur en proposant un nouveau procédé d'étalonnage unique, rapide, simple et reproductible permettant de diminuer la consommation de réactifs consacrée à l'étalonnage, tout en diminuant également l'encombrement des plaques de titration.

10 Ce but est atteint en ce sens que la présente invention concerne un procédé d'étalonnage, ne nécessitant qu'un seul système d'étalonnage, permettant de quantifier simultanément plusieurs analytes dans un même échantillon biologique, procédé qui repose sur la préparation et  
15 l'utilisation d'un réactif immunologique spécifique.

Plus particulièrement, un premier aspect de la présente invention concerne un procédé de préparation d'un réactif immunologique entrant dans la composition d'un système d'étalonnage appliqué au dosage d'analytes  
20 multiples dans un même échantillon biologique, ledit procédé mettant en oeuvre différentes catégories de particules, chaque catégorie de particules étant sensibilisée par association avec un ligand spécifique de l'un des analytes à doser, ledit procédé comprenant les  
25 étapes qui consistent à :

a) déterminer, pour chaque catégorie de particules sensibilisées et pour chacune de n quantités données de ligand associées auxdites particules, la courbe de réponse en fonction de la concentration en composé homologue sur  
30 une gamme de concentrations correspondant à la plage de mesure connue de l'analyte à doser;

b) sélectionner, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, la courbe correspondant à la plus petite quantité de ligand qui donne un signal de réponse  
35 significatif et qui est compatible avec l'utilisation d'une dilution d'échantillon et d'un réactif de marquage communs à tous les analytes simultanément dosés ;

c) évaluer, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, d'après la courbe retenue à l'étape b), le signal moyen correspondant au signal associé à un point caractéristique de chacune desdites courbes, obtenant ainsi  
5 autant de signaux moyens que de catégories de particules ;

d) ajuster, le cas échéant, les quantités de ligand associé à chaque catégorie de particules de sorte que l'ensemble des signaux moyens évalués à l'étape c) soit compris dans un rapport de 1 à 5, et

10 e) mélanger, dans un solvant approprié, les différentes catégories de particules sensibilisées qui répondent au critère de l'étape d).

Le procédé objet de la présente invention s'applique donc à des procédés de dosage mettant en oeuvre différentes  
15 catégories de particules sensibilisées. Plus particulièrement, de tels procédés consistent principalement en des immunodosages du type :

- dosage direct, par une méthode immunométrique ou "sandwich", par exemple, d'un anticorps ayant réagi avec  
20 l'antigène spécifique fixé préalablement sur les particules,

- dosage direct, par une méthode immunométrique ou "sandwich", par exemple, d'un antigène ayant réagi avec l'anticorps spécifique fixé préalablement sur les  
25 particules, ou

- dosage indirect, par une méthode dite "par compétition", d'un antigène entrant en compétition avec un antigène similaire marqué, pour sa réaction avec l'anticorps préalablement fixé sur les particules, ou vice-  
30 versa.

Ces différents dosages seront décrits plus en détail par la suite.

La réaction développée par mise en contact des différentes catégories de particules, sensibilisées chacune  
35 par un ligand, avec les analytes à doser est mesurée par cytométrie en flux selon différents modes d'identification des particules.

On peut citer, par exemple, des particules de couleurs différentes et de taille uniforme (identifiées selon leur couleur spécifique, avec quantification des réactions analyte-ligand par adjonction d'un composé externe de longueurs d'excitation et d'émission différentes de celles des particules), des particules de tailles différentes et de couleur identique (identifiées selon leur taille, avec quantification des réactions analyte-ligand par mesure de la taille des agrégats résultants) ou encore des particules de tailles différentes et de couleur identique (classées selon leur taille, avec quantification des réactions analyte-ligand par adjonction d'un composé externe de longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes de celles des particules). En pratique, l'un ou l'autre de ces procédés est sélectionné en fonction du nombre, plus ou moins important, de paramètres à tester.

Ces particules sont constituées généralement de polystyrène. Toutefois, elles peuvent être également constituées de tout polymère leur conférant des propriétés physico-chimiques spécifiques (fonctionnalité, densité ou encore solubilité) comme du styrène-acide maléique, du styrène-acide méthacrylique, du styrène-acrylamide ou du poly(méthacrylate de méthyle).

Par "ligand", il faut comprendre un antigène, un anticorps, mono- ou polyclonal, ou toute molécule capable de se fixer aux particules et qui est susceptible d'interagir, de quelque manière que ce soit, directement ou indirectement, avec l'analyte à doser.

On entend par "antigène" toute substance à partir de laquelle peut être générée la production d'anticorps. Parmi ces substances, on peut citer les protéines, les haptènes, les allergènes, les peptides, les médicaments ou encore les drogues.

Par "composé homologue", il faut comprendre un anticorps, un antigène ou toute molécule capable de se fixer à un ligand donné et dont le site d'interaction avec ledit ligand est similaire au site d'interaction entre

l'analyte à doser et ledit ligand. Le composé homologue peut être l'analyte lui-même.

La première étape du procédé consiste donc à déterminer pour chaque catégorie de particules sensibilisées, telles que décrites plus haut, la  
5 corrélation qui existe, pour une quantité donnée de ligand fixée aux particules, entre la quantité de composé homologue et la grandeur du signal émis, représentatif des interactions ligand/analyte.

10 En pratique, pour chaque catégorie de particules, plusieurs essais sont effectués en fixant une quantité donnée, différente pour chaque essai, d'un même ligand auxdites particules, en mettant ensuite en contact les particules ainsi sensibilisées avec différentes quantités  
15 de composé homologue, identiques pour l'ensemble des essais, et en mesurant le signal résultant de leur interaction.

Plus particulièrement, les quantités de ligand utilisées varient par pas de 2 à 4.

20 Les différentes quantités de composé homologue sont sélectionnées de manière à être comprises dans la plage de mesure de l'analyte que l'on cherche à doser. Ainsi, si l'on cherche à doser un analyte dont la concentration peut varier entre 0 et 100 unités biologiques, on choisira, par  
25 exemple, six quantités données de composé homologue correspondant à 0, 20, 40, 60, 80 et 100 unités biologiques. Dans la pratique, on utilise une population d'échantillons caractérisés et certifiés sur des critères clinico-biologiques, c'est-à-dire dont la présence ou  
30 l'absence en un analyte donné est validée par un diagnostic clinique et/ou par l'estimation de l'analyte par une ou plusieurs autre(s) méthode(s) de dosage.

Le résultat de cette opération se traduit par l'obtention d'une courbe dose/réponse entre la quantité de  
35 composé homologue et les signaux obtenus pour chacune des n quantités données de ligand.

Le concept d'expression de la concentration en unités biologiques repose sur l'affectation, par exemple, d'une gamme 0-150 à la plage de mesure de chacun des analytes à doser. On comprend que ces plages de mesure diffèrent, dans l'absolu, d'un analyte à l'autre et que, par suite, une même concentration en différents analytes exprimée en unités biologiques, par exemple 95 unités biologiques (en abrégé 95 UB) ne correspond pas à la même concentration, dans l'absolu, en ces mêmes analytes. La concentration en composés homologues est exprimée, de même façon, en unités biologiques sur une gamme identique pour tous les analytes.

A ce niveau, il faut noter que la sensibilisation des particules peut être effectuée de différentes manières, à savoir par covalence, par le biais d'une couche moléculaire intermédiaire biologiquement et/ou chimiquement réactive, ou encore par l'utilisation d'un système d'interaction par affinité.

Les particules sensibilisées, dans la mesure où elles comportent une fonctionnalité réactive, peuvent être sensibilisées par covalence. Ainsi, de nombreux protocoles d'immobilisation ont été décrits comme faisant intervenir de façon non limitative les groupements fonctionnels suivants entre les particules et le ligand :

- $\text{COOH/R-NH}_2$  ou  $\text{R-OH}$ ,
- $\text{CO-NH}_2/\text{NH}_2\text{-NH}_2$ ,
- $\text{C(=O)-O-CH}_3/\text{NH}_2\text{-NH}_2$ ,
- $\text{NH}_2\text{CHO/RCOOH}$ , ou encore
- $\text{R-NH}_2$  ou  $\text{NH}_2\text{-NH}_2$ .

Il est à noter que, lors de l'utilisation de la plupart des couples cités plus haut, il est nécessaire d'activer préalablement certaines fonctions, comme par exemple les fonctions  $\text{COOH}$ , afin qu'elles puissent réagir, par exemple, avec les groupements fonctionnels du ligand, tels que des groupements amines aliphatiques ou aromatiques.



Selon une autre forme d'exécution préférée, l'activation peut être réalisée par des carbodiimides hydrosolubles, et être effectuée en une seule étape ou, selon une forme d'exécution particulièrement préférée, en 5 deux étapes, avec le carbodiimide seul ou en présence de N-hydroxysuccinimide. Elle est suivie de l'élimination de l'excès d'activateur avant fixation du ligand.

Selon encore une autre forme d'exécution, un bras espaceur homo- ou hétéro-bifonctionnel, présentant des 10 fonctions chimiques réactives à chaque extrémité, respectivement identiques ou différentes, peut être fixé aux particules préalablement activées. Ces bras de longueur et de fonctionnalité variables peuvent être activés et couplés par covalence, dans un premier temps, aux 15 particules par l'une des extrémités, et dans un deuxième temps, au composé à fixer, par l'autre extrémité.

Des intermédiaires chimiquement ou biologiquement actifs peuvent également être utilisés pour la sensibilisation. Ils créent à la surface des 20 microparticules une couche moléculaire intermédiaire constituée par une protéine (telle que l'albumine), un mélange de protéines ou un polymère (tel que la polylysine). Ce procédé est particulièrement utilisé dans le cas de particules de petite taille qui peuvent ensuite 25 être couplées par l'intermédiaire d'agents de liaison sur les fonctions de cette couche intermédiaire.

Une autre voie de sensibilisation, cette fois non covalente, consiste à utiliser, de façon non limitative, des systèmes d'interaction par affinité :

- 30 - le système biotine-avidine, en utilisant des particules couplées à l'avidine qui sont mises en présence de composés ayant été préalablement biotinylés,
- la protéine A ou la protéine G, disposant d'un 35 récepteur pour le fragment Fc des immunoglobulines, permettant l'immobilisation d'un anticorps et l'orientation vers l'extérieur de ses fragments

Fab, responsables de la reconnaissance antigénique, ou encore

- l'immobilisation indirecte par l'intermédiaire d'un anticorps spécifique du composé à fixer.

5 Cette énumération n'est aucunement limitative et il est évident que tout procédé de sensibilisation similaire connu de l'homme du métier peut également être utilisé.

Pour chaque ligand à fixer, la sélection d'un des systèmes précités est réalisée initialement pendant la  
10 phase initiale de mise au point. Les conditions opératoires sont ensuite fixées et appliquées ultérieurement de façon systématique.

Dans une forme d'exécution préférée, le milieu de sensibilisation est constitué d'eau tamponnée ayant un pH  
15 compris entre 5 et 9 et une force ionique comprise entre 0,01 et 0,1. Afin de maintenir constant le milieu, le ligand peut être mis en suspension dans le même milieu avant d'effectuer ladite sensibilisation.

L'intérêt d'un tel système réside dans sa simplicité  
20 d'utilisation, son faible coût et son indépendance réactionnelle par rapport aux autres réactions simultanées. Cela est rendu possible par le fait que la réaction produite par chaque catégorie de particules sensibilisées est standardisée et reproductible, que le signal fourni par  
25 cette réaction est représentatif de l'ensemble des réactions ligand-analyte se développant simultanément et que l'ensemble de ces réactions est maîtrisé au niveau du procédé de sensibilisation de chaque catégorie de  
30 particules de façon à ce qu'elles produisent toutes un signal similaire en présence d'échantillons de même degré de positivité, c'est-à-dire comprenant sensiblement la même quantité en l'analyte dosé telle qu'exprimée sur sa gamme d'unités biologiques particulière.

Une fois les courbes dose/réponse obtenues, il est  
35 déterminé, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, comme décrit à l'étape b), la courbe correspondant à la plus petite quantité de ligand donnant,

graphiquement, un signal de lecture significatif et compatible avec l'utilisation d'une dilution d'échantillon ainsi que d'un réactif de marquage communs pour l'ensemble des analytes simultanément détectés.

5 Par "signal de réponse significatif", il faut comprendre un signal suffisamment élevé pour assurer une précision de lecture sur l'ensemble de la plage de mesure.

En pratique, la courbe sélectionnée doit être sensiblement linéaire et avoir une amplitude de mesure  
10 suffisamment élevée.

Chaque type de particule est donc sensibilisé par l'une des techniques décrites plus haut en employant la quantité de ligand déterminée ci-dessus.

L'étape suivante c) consiste alors à déterminer le  
15 signal moyen (SM) associé à une concentration en unités biologiques, identique pour tous les analytes.

Pour ce faire, un point caractéristique de la courbe dose/réponse retenue à l'étape b) est sélectionné et le signal correspondant graphiquement audit point est pris  
20 comme signal moyen SM.

Le point caractéristique, autrement appelé point positif ou de forte positivité, est choisi arbitrairement dans le quart supérieur de la partie linéaire de la courbe.

Les signaux moyens SM obtenus pour les différentes  
25 catégories de particules sensibilisées sont ensuite comparés entre eux et, si nécessaire, réajustés de sorte qu'ils soient tous compris dans un rapport de 1 à 5. En pratique, pour les catégories de particules ayant un SM non compris dans ledit rapport, la réactivité est alors  
30 réajustée en sélectionnant dans la courbe dose/réponse une autre quantité de ligand et en recommençant l'opération de sensibilisation desdites particules par cette nouvelle quantité de ligand jusqu'à obtenir que le SM résultant entre dans le rapport de 1 à 5 précité.

35 Le fait que les SM des différentes particules sensibilisées constituant le réactif immunologique soient tous compris dans un rapport de 1 à 5 est déterminant pour

assurer une réactivité immunologique relativement équivalente pour chaque type de particules sensibilisées utilisées et donc d'obtenir, dans une gamme de mesures compatible avec la réalité biologique, des valeurs  
5 suffisamment proches pour permettre l'utilisation d'un système d'étalonnage unique et commun à l'ensemble des analytes.

Le réactif immunologique est alors constitué par mélange, dans un solvant, des différents types de  
10 particules sensibilisées ainsi obtenues.

On peut citer comme solvants possibles : des mélanges de protéines et d'acides aminés ou encore un mélange de protéines inertes vis-à-vis des analytes à doser et permettant une stabilisation de particules.

15 En tout état de cause, les solvants utilisés sont sélectionnés de manière à permettre la conservation de l'ensemble des particules sensibilisées, et leur choix se trouve donc dicté par la nature des ligands les plus contraignants.

20 De ce fait, ledit solvant peut être défini de sorte qu'il est adapté et commun à l'ensemble des ligands.

Afin de rendre industrialisable un tel procédé de préparation du réactif immunologique, faisant intervenir la réactivité individuelle de différentes particules couplées  
25 à des ligands spécifiques, les conditions expérimentales de sensibilisation, à savoir le pH, la force ionique, le volume, la température ou encore la durée du couplage, sont préalablement fixés et standardisés pour l'ensemble des particules. Seule varie ensuite, comme décrit plus haut, la  
30 quantité de ligand à ajuster.

En pratique, le solvant utilisé est tamponné à un pH compris entre 7 et 9 et a une force ionique comprise entre 0,01 et 0,1.

Selon un second aspect de la présente invention,  
35 celle-ci porte sur un réactif immunologique destiné au dosage d'analytes multiples dans des échantillons biologiques, ledit réactif comprenant un solvant et,

mélangées au sein dudit solvant, différentes catégories de particules, dont chacune est sensibilisée par association avec une quantité donnée en un ligand spécifique de l'un des analytes à doser, avec, pour chacune des catégories de  
5 particules, et pour une concentration donnée en composé homologue du ligand, telle qu'exprimée en unités biologiques, ladite quantité donnée de ligand débouchant sur un signal dit "signal moyen", qui est compris dans un rapport de 1 à 5 avec les signaux moyens obtenus pour les  
10 autres catégories de particules.

Selon un troisième aspect, la présente invention concerne un kit de dosage d'analytes multiples dans des échantillons biologiques mettant en oeuvre différentes catégories de particules, chaque catégorie de particules  
15 étant sensibilisée par un ligand spécifique de l'un des analytes à doser, qui comprend :

i) un réactif immunologique issu du procédé tel que décrit plus haut,

ii) au moins un standard d'étalonnage constitué d'un  
20 unique composé homologue réagissant avec l'une des catégories de particules entrant dans la composition du réactif immunologique,

iii) une table de correspondance entre la concentration, exprimée en unités biologiques, du composé  
25 homologue constituant le standard d'étalonnage et celle de chacun des composés homologues aux autres ligands fixés sur les autres catégories de particules entrant dans la composition du réactif immunologique, et

iv) un réactif de marquage.

30 Plus particulièrement, ledit standard d'étalonnage comprend un composé homologue réagissant directement ou indirectement avec le ligand fixé à la particule sensibilisée.

La fixation indirecte peut se faire, par exemple, par  
35 l'intermédiaire d'une protéine utilisée pour saturer les sites de fixation de la particule non occupés par le

ligand. Cette protéine doit être choisie de façon à ne pas interférer avec le système spécifique et être présente sur une seule catégorie de particule. Dans ce cas, le milieu de quantification devra contenir un réactif de marquage  
5 spécifique des analytes à doser (constitué d'un ou de plusieurs composés) et un réactif de marquage spécifique de la protéine inerte.

Dans une première forme d'exécution, ledit composé homologue est de même origine que l'analyte à doser, par  
10 exemple, d'origine humaine.

Dans une seconde forme d'exécution, ledit composé homologue et l'analyte à doser sont d'origines différentes.

Alors que, par exemple, l'analyte à doser est d'origine humaine, tel que des autoanticorps présents dans  
15 des échantillons sanguins humains, le composé homologue peut être, par exemple, d'origine animale pour autant qu'il soit capable de réagir spécifiquement avec le ligand. Le milieu de quantification devra, dans ce cas, contenir, à la fois un réactif de marquage spécifique des échantillons  
20 d'origine humaine et un réactif de marquage spécifique du standard d'origine animale.

La préparation du standard d'étalonnage implique une optimisation préalable de sa concentration de façon à produire un SM compris dans un rapport de 1 à 5 par rapport  
25 aux SM obtenus pour chaque catégorie de particules sensibilisées lors de la préparation du réactif immunologique.

Pour ce qui est de la "table de correspondance", celle-ci consiste en un référentiel, pouvant se présenter  
30 sous la forme d'un tableau, d'un graphique, etc., qui donne les différentes concentrations, exprimées en unités biologiques, du composé homologue constituant le standard d'étalonnage et celle de chacun des composés homologues aux autres ligands fixés sur les autres catégories de  
35 particules entrant dans la composition du réactif immunologique.

La table de correspondance est réalisée empiriquement, préalablement à la préparation des kits, de la manière suivante.

On fait réagir plusieurs échantillons, comprenant des quantités différentes et connues d'analytes à doser avec le réactif immunologique qui fera partie du kit. On mesure les signaux résultants et l'on trace, pour chaque analyte, la droite de régression linéaire liant les signaux émis aux quantités connues, exprimées en unités biologiques, des analytes dosés, selon une équation de type  $y=ax$ , avec  $y=\text{signal}$  et  $x=\text{concentration}$  en unités biologiques.

On mesure, de même, le signal obtenu lors de la réaction entre le standard d'étalonnage et le réactif immunologique et l'on relève, sur chaque courbe précédemment obtenue, la concentration, exprimée en unités biologiques, correspondant à cette même valeur de signal.

C'est l'ensemble de ces concentrations en analytes, exprimées en unités biologiques, qui constitue la table de correspondance.

La concentration du standard peut être ensuite vérifiée à partir de la table de correspondance et ajustée si nécessaire.

Dans une variante, il peut être souhaité de réaliser une gamme d'étalonnage, c'est-à-dire de partir de plusieurs standards d'étalonnage constitué chacun du même composé homologue, mais selon différentes concentrations.

Dans ce cas, le principe de réalisation de la table de correspondance reste le même, mis à part que l'on trace pour chaque analyte, à partir des différents signaux obtenus, la droite de régression liant les signaux émis aux quantités connues, en unités biologiques, des analytes à doser selon une équation de type  $\log y=a(\log x)$ , avec  $y=\text{signal}$  et  $x=\text{concentration}$  en unités biologiques.

Cette équation est ensuite appliquée aux signaux correspondant aux différentes concentrations connues de standard d'étalonnage de façon à déduire la correspondance

entre chacune desdites concentrations et la concentration de chaque analyte, exprimée en unités biologiques.

Pour ce qui est du "réactif de marquage", celui-ci consiste en un composé immunologique susceptible de quantifier la réaction entre les analytes et le réactif immunologique, ledit composé immunologique étant couplé à un marqueur qui est, de préférence un fluorochrome.

Par "composé immunologique", il faut comprendre tout composé, naturel ou de synthèse, susceptible de se complexer spécifiquement avec un composé complémentaire, tels que les anticorps et les antigènes.

Selon une forme d'exécution préférée, ledit réactif de marquage réagit avec le complexe composé homologue ou analyte à doser / ligand, auquel cas le dosage est direct, ou avec le ligand non complexé, auquel cas le dosage est indirect.

En outre, le réactif de marquage peut être préparé à partir d'un composé unique, réagissant avec, par exemple, une spécificité antigénique commune à l'ensemble des composés homologues, ou résulter du mélange de différents composés réagissant spécifiquement avec différents composés homologues.

Selon un dernier aspect de la présente invention, celle-ci porte sur un procédé de dosage d'analytes présents dans un échantillon biologique et, plus particulièrement, un procédé de mise en oeuvre du kit tel que décrit plus haut qui consiste à mesurer les signaux résultants de l'interaction entre le réactif immunologique et, d'une part, l'échantillon biologique, d'autre part, le standard d'étalonnage, et à déterminer et appliquer, aux différents signaux résultants, un facteur de correction de manière à obtenir la titration, exprimée en unités biologiques, de chaque analyte de l'échantillon, ledit facteur de correction étant le rapport entre le signal obtenu pour le standard d'étalonnage et les concentrations issues de la table de correspondance.



Le procédé de mise en oeuvre du kit selon la présente invention repose donc sur trois étapes, à savoir une première étape de détermination des différents signaux émis par cytométrie en flux, une seconde étape de calcul pour  
5 déterminer les différents facteurs de correction à partir du signal émis par le standard d'étalonnage et une troisième étape de calcul pour la titration de chaque analyte de l'échantillon à partir du facteur de correction précédemment obtenu et les signaux émis par les différents  
10 échantillons testés.

Plus particulièrement, le procédé objet de la présente invention comprend les étapes suivantes :

a) incuber, d'une part, l'échantillon biologique et, d'autre part, le standard d'étalonnage, avec une quantité  
15 prédéterminée de réactif immunologique ;

b) ajouter le réactif de marquage ;

c) mesurer, par cytométrie en flux, les signaux émis, d'une part, par le standard d'étalonnage, d'autre part par l'échantillon ;

20 d) déterminer, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, un facteur de correction qui correspond au rapport entre la concentration en unités biologiques de chaque analyte à doser telle que donnée par la table de correspondance et le signal correspondant au standard  
25 d'étalonnage et mesuré à l'étape c) ;

e) multiplier par ledit facteur de correction, calculé pour chaque analyte, le signal émis par chaque catégorie de particules et mesuré à l'étape c) pour en déduire la concentration en unités biologiques de chaque  
30 analyte dans l'échantillon testé.

Dans une première variante, le procédé objet de la présente invention peut être appliqué à des dosages directs. Dans de tels dosages, le réactif de marquage est spécifique des analytes que l'on cherche à doser et, de ce  
35 fait, la quantité d'analytes compris dans un échantillon est directement proportionnelle au signal émis par ledit réactif de marquage.

Une première application à la quantification simultanée et directe d'anticorps de spécificités antigéniques différentes est envisagée avec lesdits analytes à doser qui consistent en des anticorps, lesdits  
5 ligands en des antigènes et ledit réactif de marquage est constitué par un ou plusieurs seconds anticorps marqués par un fluorochrome réagissant spécifiquement avec les anticorps que l'on cherche à doser.

Dans ce cas, le réactif immunologique est constitué  
10 de différentes catégories de particules sensibilisées chacune par un antigène spécifique. Les anticorps que l'on cherche à doser vont se complexer avec le ou lesdits antigène(s) fixé(s) aux particules. Le réactif de marquage, qui est constitué par un ou plusieurs second(s) anticorps  
15 marqué(s) par un fluorochrome et spécifique(s) des anticorps que l'on cherche à doser, va se fixer auxdits anticorps préalablement complexés avec les antigènes formant la couche de sensibilisation des particules. Ainsi, le signal émis par le fluorochrome associé à chaque  
20 catégorie de particules est proportionnel à la quantité d'anticorps présents dans l'échantillon.

Par "seconds anticorps", il faut comprendre toute substance capable de se complexer avec les anticorps que l'on cherche à doser, c'est-à-dire capable de réagir avec  
25 un épitope desdits anticorps différent de celui mis en oeuvre pour assurer leur fixation au ligand.

Une seconde application à la quantification simultanée et directe de différents antigènes est envisagée avec lesdits analytes à doser qui consistent en des  
30 antigènes, lesdits ligands en des anticorps et ledit réactif de marquage en un mélange de seconds anticorps marqués par un fluorochrome réagissant spécifiquement avec les antigènes que l'on cherche à doser.

Le principe est ici identique à celui décrit plus  
35 haut.

Dans une seconde variante, le procédé objet de la présente invention peut être appliqué à des dosages dits

indirects. De tels dosages sont non plus basés uniquement sur la complémentarité entre deux espèces immunologiques, mais sur la compétition entre deux espèces immunologiques proches à se complexer avec une troisième espèce immunologique.

Ainsi, selon une première possibilité, il est envisagé la quantification simultanée et indirecte de différents antigènes avec lesdits analytes à doser qui consistent en des antigènes, lesdits ligands en des anticorps et ledit réactif de marquage en un mélange d'antigènes marqués par un fluorochrome entrant en compétition avec les analytes à doser pour se complexer avec les ligands.

Dans ce cas, le réactif immunologique est constitué de différentes catégories de particules sensibilisées chacune par un anticorps spécifique. Les antigènes que l'on cherche à doser vont alors entrer en compétition avec le ou lesdits antigènes, marqués par un fluorochrome, constituant le réactif de marquage. Ainsi, l'augmentation de la concentration en antigène que l'on cherche à doser entraîne l'augmentation de la concentration en complexes antigène que l'on cherche à doser / anticorps fixé, au détriment de la formation de complexes antigène marqué / anticorps fixé, avec corrélativement une diminution du signal. Il en résulte que le signal émis par le fluorochrome associé à chaque catégorie de particules est inversement proportionnel à la quantité d'antigènes présente dans l'échantillon.

Une seconde application à la quantification simultanée et indirecte de différents anticorps est envisagée avec lesdits analytes à doser qui consistent en des anticorps, lesdits ligands en des antigènes et ledit réactif de marquage en un mélange d'anticorps marqués par un fluorochrome entrant en compétition avec les analytes à doser pour se complexer avec les ligands.

La présente invention sera mieux comprise à la lecture des exemples suivants.

## MATERIEL ET METHODE

Le système de particules sensibilisées utilisées dans les exemples ci-après appartient au système Luminex®.

Les particules utilisées sont de taille uniforme (5,5  $\mu\text{m}$ ) et se distinguent les unes des autres par une coloration spécifique (100 couleurs, du rouge à l'orange). Le système de détection de ces particules est un cytomètre en flux interfacé avec un système informatique pour le traitement du signal émis par différents lasers : un premier laser, en classant chaque catégorie de particules sur la base de son intensité de fluorescence unique, permet d'identifier quel composé est analysé. Parallèlement, un laser vert excite un composé fluorescent externe utilisé pour quantifier la réaction spécifiquement associée à chaque catégorie de particules colorées.

Selon d'autres formes d'exécution, et d'après les connaissances de l'homme du métier, il peut également être utilisé des lasers autres qu'un laser vert.

Exemple 1 : Dosage simultané des anticorps anti-nucléaires (ANA) dirigés contre les antigènes suivants : SSA, SSB, Sm, Sm/RNP, Scl70, Jo1, dsDNA, centromère.

25

a) Préparation du réactif immunologique.

Huit catégories de particules de polystyrène colorées et fonctionnalisées par des groupements COOH sont sélectionnées. Préalablement à la sensibilisation, les particules sont activées par un procédé qui consiste en :

- la séparation des huit catégories de particules dans huit tubes différents,
- l'ajout de 1 ml d'une solution de carbodiimide dosé entre 10 et 40 mg/ml, fraîchement préparée, à 1 ml de chaque type de particules (soit environ  $10^7$  particules),
- l'incubation pendant 20 à 60 minutes à température ambiante, et

- trois lavages des particules à l'eau distillée en centrifugeant à 10000×g pendant 2 minutes pour éliminer l'excès de carbodiimide.

Parallèlement, les quantités en chaque ligand, ou antigène, devant être fixées aux différentes catégories de particules ont été déterminées suivant l'invention, comme décrit plus haut.

Les particules ainsi activées sont ensuite sensibilisées par des antigènes différents, selon la catégorie de particules, par suspension de chaque solution de particules activées dans un volume de 1 ml contenant de 50 à 500 µg d'antigènes différents.

On obtient ainsi le système suivant :

15

Catégorie de Particules	Nature de l'antigène (ligand)
1	SSA
2	SSB
3	Sm
4	Sm/NRP
5	Scl70
6	Jo1
7	dsDNA
8	centromère

Les étapes suivantes consistent en :

- l'incubation pendant 4 à 6 heures à température ambiante,
- le lavage des particules à l'eau distillée,
- la mise en suspension dans un tampon pH 8 contenant un mélange de substances aminées afin de saturer les sites libres et ramener les particules à une concentration de l'ordre de  $10^6$  à  $5 \cdot 10^6$  particules par ml.

Le réactif immunologique est alors constitué d'un mélange d'un aliquote de 500 µl de chaque catégorie de

particules colorées et sensibilisées, et il est conservé à +4°C jusqu'à son utilisation.

Les figures 1 et 2 donnent, à titre d'exemple, trois courbes dose/réponse obtenues pour deux types de ligands  
5 (respectivement SSA et SSB) exprimant le signal de fluorescence émis (axe des Y) en fonction de la concentration en composé homologue en unités biologiques (axe des X). Ces courbes permettent de sélectionner la plus petite quantité de ligand correspondant à un signal de  
10 réponse significatif, ceci sur une plage de mesure de 0 à 150 unités biologiques environ.

Pour chaque système, cinq échantillons ont été sélectionnés en fonction de leur titre en unités biologiques, déterminé par ELISA (coffret ENA-LISA,  
15 commercialisé par la déposante). La concentration en composé homologue, la prise d'essai et la dilution sont communes.

Pour ce qui est du système SSA (Figure 1), les trois courbes représentées A, B et C correspondent respectivement  
20 à des concentrations en antigènes SSA de 300, 150 et 75 µg/ml de particules. La courbe retenue pour le système SSA est la courbe B, correspondant à une concentration de 150 µg d'antigène SSA par ml de particules. La concentration supérieure de 300 µg (courbe A) se traduit  
25 par une saturation de la réaction antigène-anticorps pour les valeurs élevées. La concentration inférieure de 75 µg (courbe C) ne permet pas d'obtenir une réponse d'amplitude suffisante, d'où une imprécision potentielle des résultats.

Pour ce qui est du système SSB, les trois courbes  
30 représentées A', B' et C' correspondent respectivement à des concentrations en antigènes SSB de 100, 50 et 25 µg/ml de particules. La courbe retenue pour le système SSB est la courbe B', correspondant à 50 µg d'antigène SSB par ml de particules. La concentration supérieure de 100 µg  
35 (courbe A') se traduisant par une courbe quasi-identique n'est pas retenue. La concentration inférieure de 25 µg

(courbe C') ne permet pas d'obtenir une réponse d'amplitude suffisante, notamment dans les faibles valeurs.

b) Etalonnage.

5 Un seul standard d'étalonnage est réalisé. Dans cet exemple, on choisit la catégorie de particules 1 fixées à l'antigène SSA. Le standard d'étalonnage, c'est-à-dire le composé homologue, est ici une solution, diluée en tampon phosphate pH 7,4, d'anticorps humains purifiés et dirigés  
10 contre l'antigène SSA.

La table de correspondance, pour ce standard d'étalonnage est la suivante :

SSA	SSB	Sm	Sm/NRP	Sc170	Jo1	dsDNA	Centro.
90 UB	60 UB	180 UB	150 UB	145 UB	120 UB	90 UB	60 UB

15 Cette table a été obtenue comme indiqué plus haut.

c) Mesure du signal émis par le standard d'étalonnage

Pour les particules 1, sensibilisées à l'antigène SSA, réagissant avec le standard d'étalonnage, on obtient  
20 par cytométrie en flux un signal moyen (SM), testé au moins en double, correspondant à 80, par exemple.

d) Détermination des facteurs de correction.

Afin de déterminer les facteurs de correction à  
25 attribuer à chaque spécificité, on divise les concentrations ci-dessus, exprimées en unités biologiques dans la table de correspondance, par la valeur du signal mesuré pour le standard d'étalonnage, c'est-à-dire la valeur obtenue avec les particules 1 sensibilisées avec  
30 l'antigène SSA (80).

On obtient les facteurs de correction suivants :

SSA	SSB	Sm	Sm/NRP	Sc170	Jo1	dsDNA	Centro.
1,12	0,75	2,25	1,87	1,81	1,5	1,12	0,75

Ces facteurs de correction seront utilisés lors du dosage d'analytes dans des échantillons biologiques. Ainsi, si l'on dose, au moyen du réactif immunologique ayant précédemment donné un signal de 80 avec le standard d'étalonnage, l'analyte SSB dans un échantillon, et que l'on obtient un signal correspondant à 120, on pourra déterminer le titre de l'analyte SSB en multipliant la valeur de ce signal par le facteur de correction associé à l'analyte SSB (ici 0,75). Le titre de SSB dans l'échantillon sera donc, dans cet exemple, égal à  $0,75 \times 120 = 90$  UB.

Exemple 2 : Dosage simultané des anticorps anti-cytoplasme de polynucléaires neutrophiles (ANCA) dirigés contre les antigènes suivants : myéloperoxydase (MPO) et protéinase 3 (PR3).

a) Préparation du réactif immunologique.

Dans cet exemple, seules deux particules colorées différentes sont sensibilisées séparément avec les deux antigènes MPO et PR3, de façon identique à l'exemple 1.

Le réactif immunologique est ensuite constitué par un mélange d'un aliquote de 500  $\mu$ l de chaque catégorie de particules colorées. Il est conservé à +4°C jusqu'à utilisation.

b) Etalonnage.

Pour l'étalonnage, selon le principe même de l'invention, on utilise un seul standard d'étalonnage. Dans cet exemple, on choisit la catégorie de particules fixées à l'antigène MPO. Le standard d'étalonnage, c'est-à-dire le composé homologue, est ici une solution, diluée en tampon phosphate pH 7.4, d'anticorps humains purifiés et dirigés contre l'antigène MPO. Le protocole est le même que celui utilisé dans l'exemple 1.



La table de correspondance, pour ce standard d'étalonnage, est la suivante :

MPO	PR3
140 UB	250 UB

5

c) Mesure du signal émis par le standard d'étalonnage

Le même protocole que dans l'exemple 1 est utilisé pour déterminer ledit signal. Le signal moyen (SM) obtenu pour le standard d'étalonnage (testé en double) réagissant avec les particules MPO correspond, par exemple, à 150.

d) Détermination des facteurs de correction

Afin de déterminer les facteurs de correction à attribuer à chaque spécificité, on divise les concentrations ci-dessus, exprimées en unités biologiques, par la valeur du signal du standard d'étalonnage, c'est-à-dire les particules 1 sensibilisées à l'antigène MPO (S=150).

On obtient les facteurs de correction suivants :

20

MPO	PR3
0.93	1.66

De manière similaire à l'exemple 1, si l'on dose, au moyen du réactif immunologique ayant précédemment donné un signal de 150 avec le standard d'étalonnage, l'analyte PR3 dans un échantillon, et que l'on obtient un signal correspondant à 110, on pourra déterminer le titre de l'analyte PR3 en multipliant la valeur de ce signal par le facteur de correction associé à l'analyte PR3 (ici 1,66). Le titre de PR3 dans l'échantillon sera donc, dans cet exemple, égal à  $1,66 \times 110 = 183$  UB.

Exemple 3 : évaluation des réactifs préparés dans les exemples 1 et 2 et comparaison avec des méthodes de références.

5            Afin d'évaluer les réactifs immunologiques préparés dans les exemples 1 et 2 et comparer leurs résultats avec ceux des méthodes de référence de type ELISA, la spécificité et la sensibilité desdits réactifs ont été étudiées.

10

a) Détermination de la spécificité.

La spécificité a été évaluée à partir de 50 échantillons sériques issus de donneurs de sang et de 34 échantillons sélectionnés pour leurs interférences biologiques potentielles (hypergammaglobulinémie, 15 gammopathies monoclonales, autres autoanticorps, échantillons plasmatiques...). Ces échantillons constituent le groupe 1.

20

b) Détermination de la sensibilité.

La sensibilité a été évaluée à partir d'échantillons sériques, sélectionnés pour chaque dosage multiparamétrique, caractérisés cliniquement et issus de l'analyse de routine d'un laboratoire d'immunologie 25 (Hôpital Tenon, Paris, France). Ces échantillons constituent le groupe 2, soit respectivement 57 et 35 échantillons pour la détection des ANA et des ANCA.

c) Protocole d'évaluation de la spécificité et de la 30 sensibilité des échantillons :

Ce protocole consiste à prélever 50  $\mu$ l de réactif immunologique préparé dans l'exemple 1 et à le mélanger, d'une part, à 100  $\mu$ l de standard d'étalonnage (déposé en double) et, d'autre part, à 100  $\mu$ l d'échantillons prédilués 35 au 1/200 dans un tampon phosphate (type PBS, pH 7,4). Les dépôts et mélanges se font dans une microplaque de 96 puits disposant à leur base d'une membrane filtrante de 1,2  $\mu$ m.

Un puits est réservé au mélange du réactif immunologique avec le tampon, seul, afin de constituer le « blanc réactif », permettant d'évaluer le signal associé à chaque catégorie de particules qui sera ensuite soustrait systématiquement du signal obtenu pour les autres puits.

Les étapes suivantes consistent à :

- incuber pendant 30 minutes à température ambiante,
- laver deux fois avec filtration à travers la membrane filtrante de la microplaque,

- remettre le milieu en suspension dans 100 µl de réactif de marquage, constitué par un anticorps de chèvre réagissant spécifiquement avec les immunoglobulines G humaines et conjugué à la phycoérythrine. Sa concentration est adaptée à l'ensemble des systèmes "ligand-composé homologue" à détecter simultanément,

- incuber pendant 30 minutes, et
- analyser par cytométrie en flux.

Ce faisant, au moins 200 particules de chaque catégorie sont analysées pendant 15 à 25 secondes selon le nombre de catégories présentes simultanément. Pendant ce temps, le système informatique classe chacune des particules selon sa couleur et détermine ensuite la fluorescence moyenne émise par le conjugué pour chaque spécificité d'anticorps.

d) Méthodes comparatives utilisées.

Les résultats obtenus avec les réactifs préparés dans les exemples 1 et 2 ont été comparés avec ceux issus de la mise en oeuvre de trousse de dosage du commerce (Biomedical Diagnostics, Marne-La-Vallée, France) : coffrets ELISA (DNA-LISA, ENA-LISA, MPO-LISA et PR3-LISA) et substrat Hep2000 pour la détermination par immunofluorescence indirecte du centromère.

## RESULTATS

### Evaluation de la spécificité (échantillons du 5 groupe 1).

détection des ANA : tous les échantillons du groupe 1  
ont été trouvés négatifs par le test multiparamétrique  
utilisant les réactifs préparés dans l'exemple 1 et par le  
10 protocole utilisant un coffret ELISA.

détection des ANCA : tous les échantillons du groupe  
1 ont été trouvés négatifs par le test multiparamétrique  
utilisant les réactifs préparés dans l'exemple 2 ; un seul  
15 résultat était discordant en utilisant un coffret  
ELISA : il s'agissait d'un faux positif pour la  
détermination de la spécificité antigénique PR3 développé  
par un échantillon issu d'un patient présentant une  
hypergammaglobulinémie IgG.

20

### Evaluation de la sensibilité (échantillons du groupe 2)

25 détection des ANA : elle a été effectuée sur 57  
échantillons cliniquement caractérisés pour la détection  
des ANA et issus du groupe 2. Une concordance de 98,7% a  
été obtenue sur 399 tests réalisés simultanément avec le  
test multiparamétrique utilisant les réactifs préparés dans  
30 l'exemple 1 et avec un coffret ELISA. La figure 3 annexée  
présente les résultats comparatifs obtenus, exprimés en  
unités biologiques (UB), pour le test multiparamétrique  
(axe des Y) par rapport au test ELISA individuel (axe des  
X). Les coefficients de corrélation sont compris entre 0,92  
35 et 0,97 pour les spécificités ANA. Pour le centromère, une  
concordance totale a été obtenue avec l'immunofluorescence  
indirecte (10 échantillons positifs et 47 échantillons

5 négatifs). La méthode d'immunofluorescence indirecte  
consiste en une méthode semi-quantitative utilisant comme  
substrat des cellules humaines tumorales Hep-2  
transfectées. La révélation des autoanticorps fixés au  
10 substrat se fait grâce à un conjugué anti-immunoglobulines  
humaines marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine. La  
présence d'anticorps anti-centromère se traduit par une  
fluorescence mouchetée sur le noyau à l'interphase. La  
lecture s'effectue au microscope à fluorescence, en  
10 déterminant la dernière dilution de l'échantillon où cette  
fluorescence reste visible.

détection des ANCA : elle a été effectuée sur 35  
échantillons cliniquement caractérisés pour la détection  
15 des ANCA et issus du groupe 2. Une concordance de 97,1% a  
été obtenue sur 70 tests réalisés simultanément avec le  
test multiparamétrique utilisant les réactifs préparés dans  
l'exemple 2 et avec un coffret ELISA. La figure 4 annexée  
présente les résultats comparatifs obtenus, exprimés en  
20 unités biologiques (UB), pour le test multiparamétrique  
(axe des Y) par rapport au test ELISA individuel (axe des  
X). Les coefficients de corrélation sont compris entre 0,87  
et 0,85 pour les spécificités ANCA. Ces coefficients plus  
faibles que ceux de la détection des ANA sont dus à la  
25 forte amplification des valeurs positives dans le cas du  
dosage multiparamétrique.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'un réactif immunologique entrant dans la composition d'un système d'étalonnage appliqué au dosage d'analytes multiples dans un même échantillon biologique, ledit procédé mettant en oeuvre différentes catégories de particules, chaque catégorie de particules étant sensibilisée par association avec un ligand spécifique de l'un des analytes à doser, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes qui consistent à :

a) déterminer, pour chaque catégorie de particules sensibilisées et pour chacune de n quantités données de ligand associées auxdites particules, la courbe de réponse en fonction de la concentration en composé homologue sur une gamme de concentrations correspondant à la plage de mesure connue de l'analyte à doser;

b) sélectionner, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, la courbe correspondant à la plus petite quantité de ligand qui donne un signal de réponse significatif et qui est compatible avec l'utilisation d'une dilution d'échantillon et d'un réactif de marquage communs à tous les analytes simultanément dosés ;

c) évaluer, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, d'après la courbe retenue à l'étape b), le signal moyen correspondant au signal associé à un point caractéristique de chacune desdites courbes, obtenant ainsi autant de signaux moyens que de catégories de particules ;

d) ajuster, le cas échéant, les quantités de ligand associé à chaque catégorie de particules de sorte que l'ensemble des signaux moyens évalués à l'étape c) soit compris dans un rapport de 1 à 5, et

e) mélanger, dans un solvant approprié, les différentes catégories de particules sensibilisées qui répondent au critère de l'étape d).

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que, dans l'étape a), les quantités de ligand utilisées varient par pas de 2 à 4.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la sensibilisation desdites particules par lesdits ligands est effectuée par covalence, par le biais d'une couche moléculaire intermédiaire biologiquement et/ou chimiquement réactive, ou encore par l'utilisation d'un système d'interaction par affinité.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration en composé homologue est exprimée en unités biologiques sur une gamme qui est identique pour tous les analytes.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le solvant utilisé à l'étape e) est adapté et commun à l'ensemble des ligands.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdits ligands consistent en des antigènes et/ou des anticorps.

7. Réactif immunologique destiné au dosage d'analytes multiples dans des échantillons biologiques, ledit réactif comprenant un solvant et, mélangées au sein dudit solvant, différentes catégories de particules, dont chacune est sensibilisée par association avec une quantité donnée en un ligand spécifique de l'un des analytes à doser, caractérisé en ce que, pour chacune des catégories de particules, et pour une concentration donnée en composé homologue du ligand, telle qu'exprimée en unités biologiques, ladite quantité donnée de ligand débouche sur un signal dit "signal moyen", qui est compris dans un rapport de 1 à 5 avec les signaux moyens obtenus pour les autres catégories de particules.

8. Kit de dosage d'analytes multiples dans des échantillons biologiques mettant en oeuvre différentes catégories de particules, chaque catégorie de particules étant sensibilisée par un ligand spécifique de l'un des analytes à doser, caractérisé en ce qu'il comprend :

i) un réactif immunologique issu du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6,

ii) au moins un standard d'étalonnage constitué d'un unique composé homologue réagissant avec l'une des catégories de particules entrant dans la composition du réactif immunologique,

5           iii) une table de correspondance entre la concentration, exprimée en unités biologiques, du composé homologue constituant le standard d'étalonnage et celle de chacun des composés homologues aux autres ligands fixés sur les autres catégories de particules entrant dans la  
10 composition du réactif immunologique, et

iv) un réactif de marquage.

9. Kit selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit standard d'étalonnage comprend un composé homologue réagissant directement ou indirectement avec le  
15 ligand fixé à la particule sensibilisée.

10. Kit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que ledit composé homologue est de même origine que l'analyte à doser.

11. Kit selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en  
20 ce que ledit composé homologue et l'analyte à doser sont d'origines différentes.

12. Kit selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce que ledit réactif de marquage consiste en un composé immunologique susceptible de  
25 quantifier la réaction entre les analytes et le réactif immunologique, ledit composé immunologique étant couplé à un marqueur qui est, de préférence un fluorochrome.

13. Kit selon la revendication 12, caractérisé en ce que ledit réactif de marquage réagit avec le complexe  
30 composé homologue ou analyte à doser / ligand, auquel cas le dosage est direct, ou avec le ligand non complexé, auquel cas le dosage est indirect.

14. Procédé de mise en oeuvre du kit selon l'une quelconque des revendications 8 à 13, caractérisé en ce  
35 qu'il consiste à mesurer les signaux résultants de l'interaction entre le réactif immunologique et, d'une part, l'échantillon biologique, d'autre part, le standard



d'étalonnage, et à déterminer et appliquer, aux différents signaux résultants, un facteur de correction de manière à obtenir la titration, exprimée en unités biologiques, de chaque analyte de l'échantillon, ledit facteur de correction étant le rapport entre le signal obtenu pour le standard d'étalonnage et les concentrations issues de la table de correspondance.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes qui consistent à :

10 a) incuber, d'une part, l'échantillon biologique et, d'autre part, le standard d'étalonnage, avec une quantité prédéterminée de réactif immunologique ;

b) ajouter le réactif de marquage ;

15 c) mesurer, par cytométrie en flux, les signaux émis, d'une part, par le standard d'étalonnage, d'autre part par l'échantillon ;

d) déterminer, pour chaque catégorie de particules sensibilisées, un facteur de correction qui correspond au rapport entre la concentration en unités biologiques de chaque analyte à doser telle que donnée par la table de correspondance et le signal mesuré à l'étape c) pour le standard d'étalonnage ;

20 e) multiplier par ledit facteur de correction, calculé pour chaque analyte, le signal émis par chaque catégorie de particules et mesuré à l'étape c) pour en déduire la concentration en unités biologiques de chaque analyte dans l'échantillon testé.

16. Procédé selon la revendication 15, appliqué à la quantification simultanée et directe d'anticorps de spécificités antigéniques différentes, caractérisé en ce que lesdits analytes à doser consistent en des anticorps, lesdits ligands consistent en des antigènes et en ce que ledit réactif de marquage est constitué par un ou plusieurs seconds anticorps marqués par un fluorochrome réagissant spécifiquement avec les anticorps que l'on cherche à doser.

17. Procédé selon l'une des revendications 15 ou 16, appliqué à la quantification simultanée et directe de

différents antigènes, caractérisé en ce que lesdits analytes à doser consistent en des antigènes, lesdits ligands consistent en des anticorps et en ce que ledit réactif de marquage consiste en un mélange de seconds anticorps marqués par un fluorochrome réagissant spécifiquement avec les antigènes que l'on cherche à doser.

18. Procédé selon la revendication 15 ou 16, appliqué à la quantification simultanée et indirecte de différents antigènes, caractérisé en ce que lesdits analytes à doser consistent en des antigènes, lesdits ligands consistent en des anticorps et en ce que ledit réactif de marquage consiste en un mélange d'antigènes marqués par un fluorochrome entrant en compétition avec les analytes à doser pour se complexer avec les ligands.

19. Procédé selon la revendication 15 ou 16, appliqué à la quantification simultanée et indirecte de différents anticorps, caractérisé en ce que lesdits analytes à doser consistent en des anticorps, lesdits ligands consistent en des antigènes et en ce que ledit réactif de marquage consiste en un mélange d'anticorps marqués par un fluorochrome entrant en compétition avec les analytes à doser pour se complexer avec les ligands.

1/4

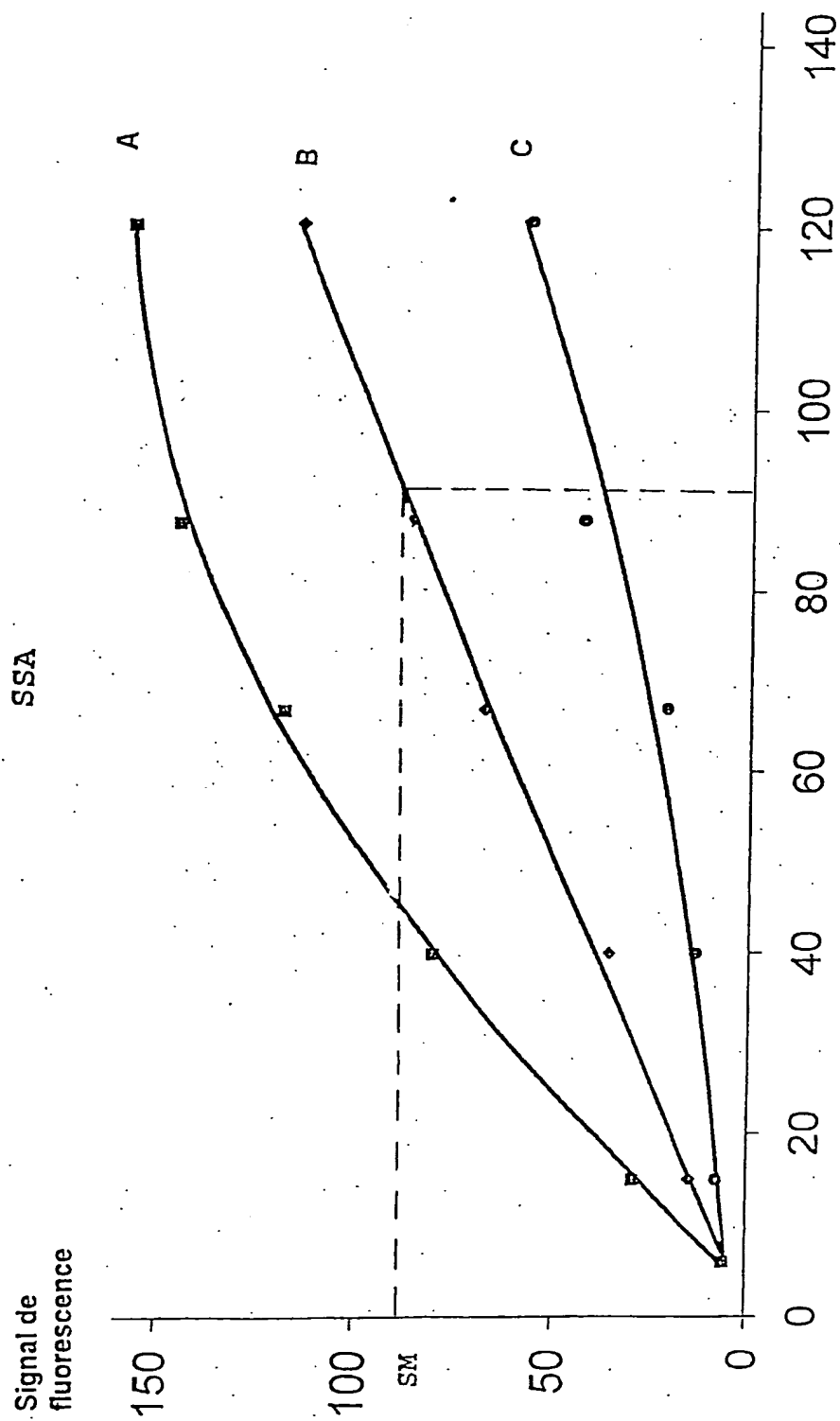


FIGURE 1

2/4

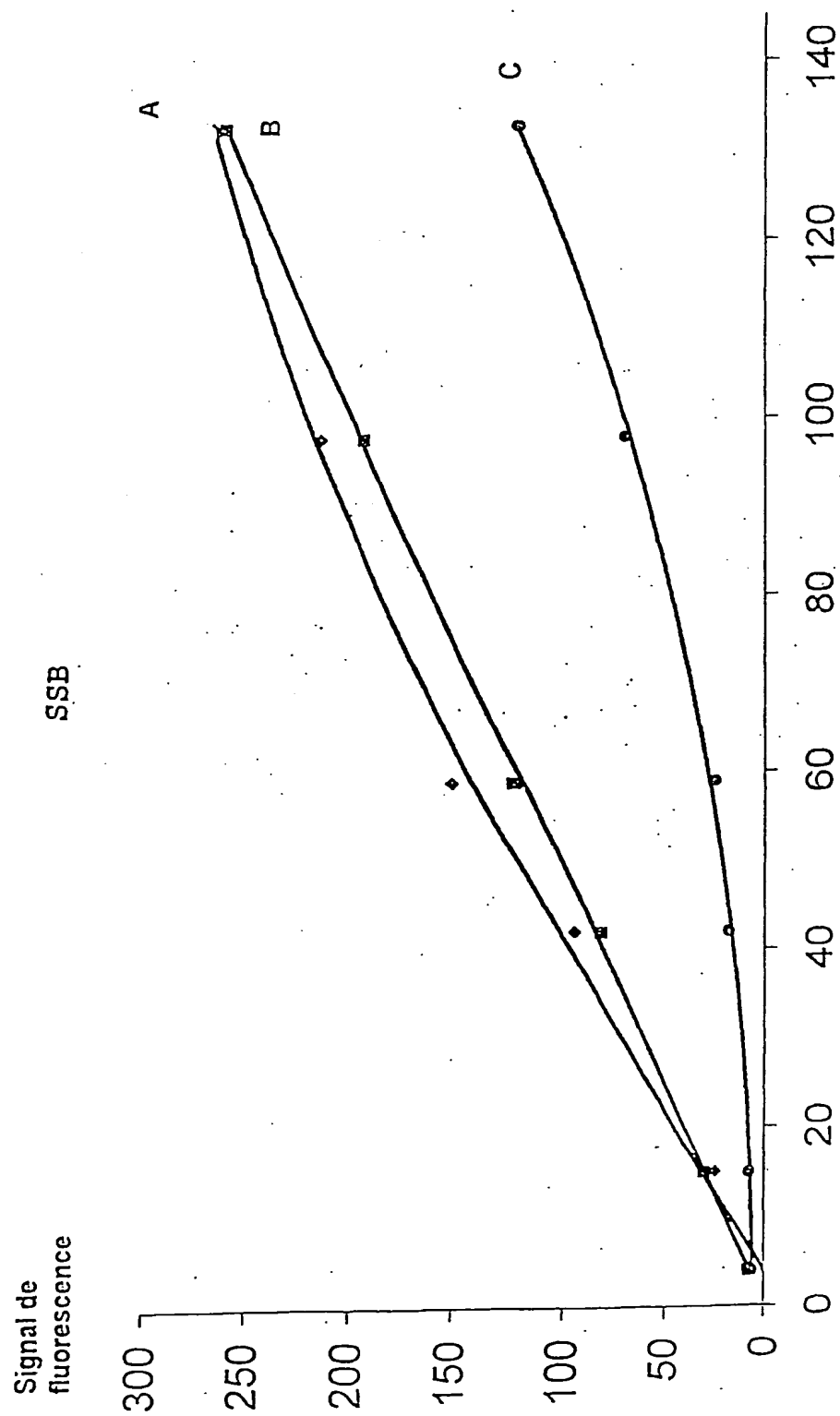


FIGURE 2

3/4

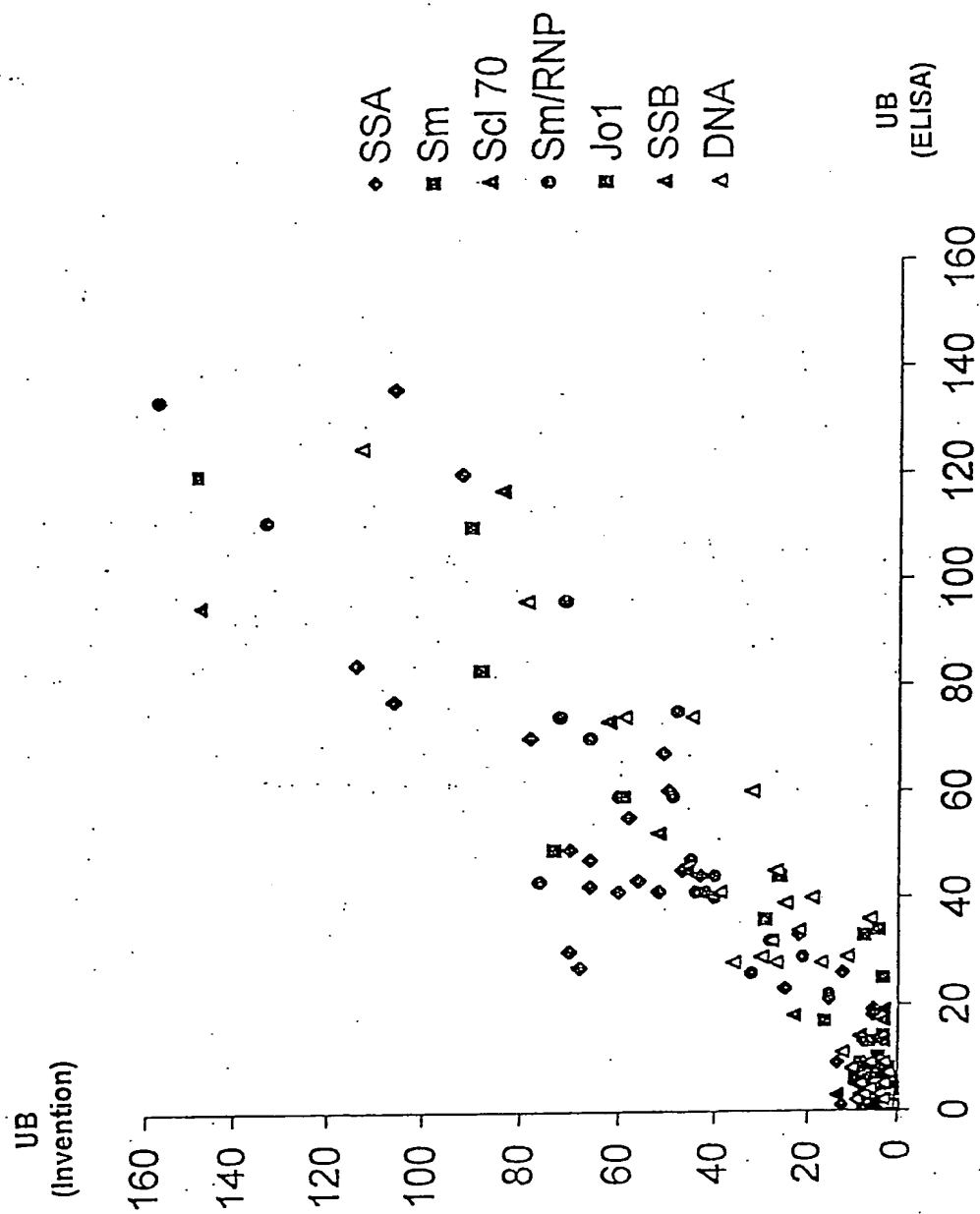


FIGURE 3

4/4

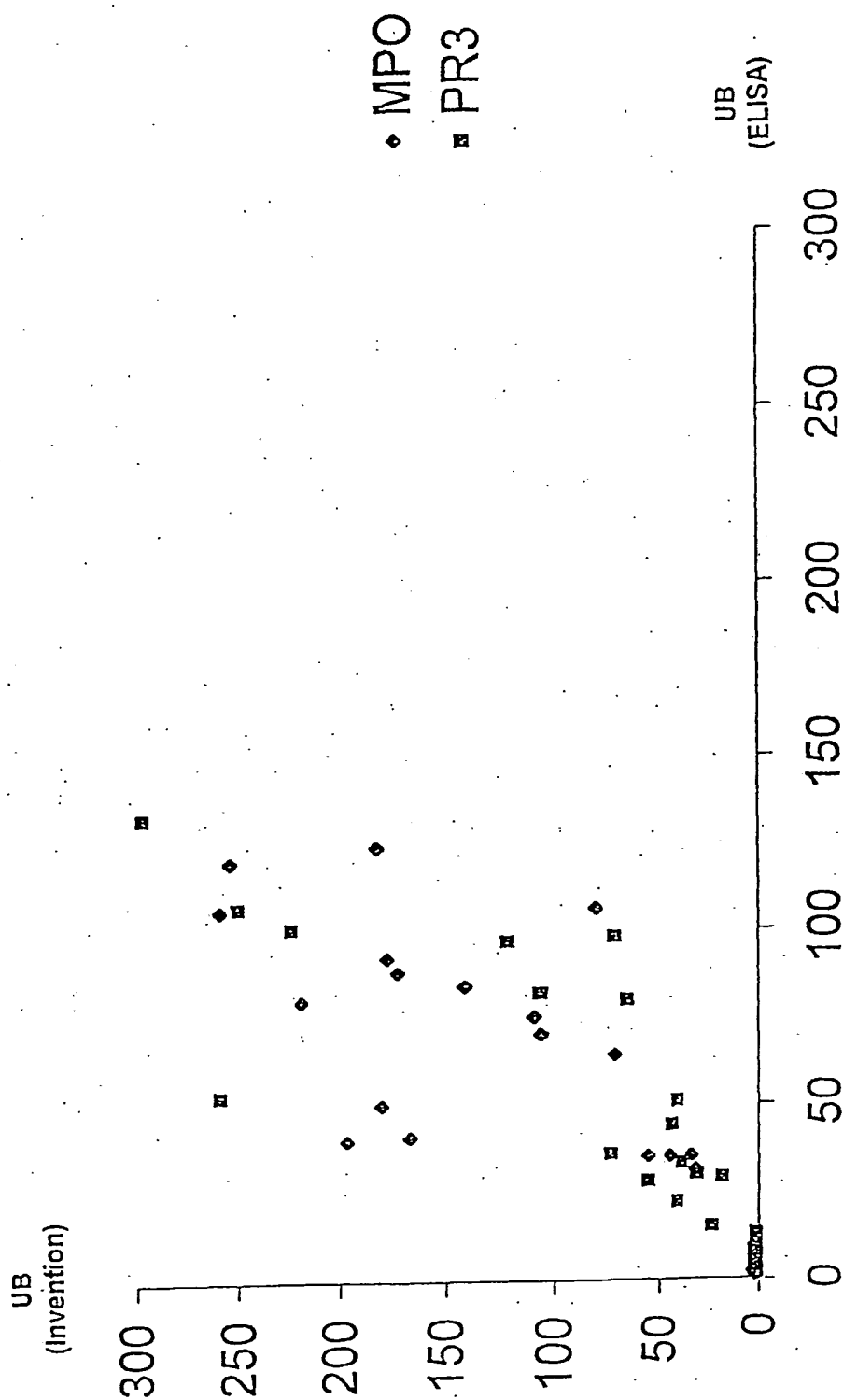


FIGURE 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/00069

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 36 05 695 A (OLYMPUS OPTICAL CO) 11 September 1986 (1986-09-11) the whole document	1-19
X	WO 92 21024 A (SIENNA BIOTECH INC) 26 November 1992 (1992-11-26) the whole document	1,7
X	WO 95 15498 A (ABBOTT LAB) 8 June 1995 (1995-06-08) abstract	1,7
A	EP 0 723 156 A (BEHRING DIAGNOSTICS INC) 24 July 1996 (1996-07-24) the whole document	1,7
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 June 2003

Date of mailing of the international search report

02/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/00069

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 01 71353 A (CORCORAN ROBERT C ;CARRON KEITH T (US); SULK ROBERTA A (US); UNIV) 27 September 2001 (2001-09-27) abstract</p> <p>-----</p>	1,7



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/00069

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 3605695	A	11-09-1986	JP 1934459 C	26-05-1995
			JP 6056383 B	27-07-1994
			JP 61193073 A	27-08-1986
			DE 3605695 A1	11-09-1986
WO 9221024	A	26-11-1992	US 5286452 A	15-02-1994
			AT 169116 T	15-08-1998
			AU 656399 B2	02-02-1995
			AU 2142092 A	30-12-1992
			CA 2103455 A1	21-11-1992
			DE 69226433 D1	03-09-1998
			DE 69226433 T2	03-12-1998
			DK 585369 T3	26-04-1999
			EP 0585369 A1	09-03-1994
			ES 2120448 T3	01-11-1998
			FI 935128 A	19-11-1993
			IE 921598 A1	02-12-1992
			JP 6507972 T	08-09-1994
			KR 215348 B1	16-08-1999
			NO 934205 A	19-11-1993
			RU 2111488 C1	20-05-1998
			WO 9221024 A1	26-11-1992
			US 5369037 A	29-11-1994
WO 9515498	A	08-06-1995	US 5518887 A	21-05-1996
			AU 1183295 A	19-06-1995
			CA 2177467 A1	08-06-1995
			EP 0731917 A1	18-09-1996
			JP 9506172 T	17-06-1997
			WO 9515498 A1	08-06-1995
EP 0723156	A	24-07-1996	AU 701544 B2	28-01-1999
			AU 4059795 A	27-06-1996
			CA 2164167 A1	21-06-1996
			EP 0723156 A2	24-07-1996
			JP 8233817 A	13-09-1996
WO 0171353	A	27-09-2001	WO 0171353 A1	27-09-2001

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/00069

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 G01N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DE 36 05 695 A (OLYMPUS OPTICAL CO) 11 septembre 1986 (1986-09-11) le document en entier ---	1-19
X	WO 92 21024 A (SIENNA BIOTECH INC) 26 novembre 1992 (1992-11-26) le document en entier ---	1,7
X	WO 95 15498 A (ABBOTT LAB) 8 juin 1995 (1995-06-08) abrégé ---	1,7
A	EP 0 723 156 A (BEHRING DIAGNOSTICS INC) 24 juillet 1996 (1996-07-24) le document en entier --- -/--	1,7

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

16 juin 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/07/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreno, C

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/00069

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 01 71353 A (CORCORAN ROBERT C ; CARRON KEITH T (US); SULK ROBERTA A (US); UNIV)  27 septembre 2001 (2001-09-27)  abrégé</p>	1,7

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/00069

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 3605695	A	11-09-1986	JP 1934459 C	26-05-1995
			JP 6056383 B	27-07-1994
			JP 61193073 A	27-08-1986
			DE 3605695 A1	11-09-1986
WO 9221024	A	26-11-1992	US 5286452 A	15-02-1994
			AT 169116 T	15-08-1998
			AU 656399 B2	02-02-1995
			AU 2142092 A	30-12-1992
			CA 2103455 A1	21-11-1992
			DE 69226433 D1	03-09-1998
			DE 69226433 T2	03-12-1998
			DK 585369 T3	26-04-1999
			EP 0585369 A1	09-03-1994
			ES 2120448 T3	01-11-1998
			FI 935128 A	19-11-1993
			IE 921598 A1	02-12-1992
			JP 6507972 T	08-09-1994
			KR 215348 B1	16-08-1999
			NO 934205 A	19-11-1993
			RU 2111488 C1	20-05-1998
			WO 9221024 A1	26-11-1992
			US 5369037 A	29-11-1994
WO 9515498	A	08-06-1995	US 5518887 A	21-05-1996
			AU 1183295 A	19-06-1995
			CA 2177467 A1	08-06-1995
			EP 0731917 A1	18-09-1996
			JP 9506172 T	17-06-1997
			WO 9515498 A1	08-06-1995
EP 0723156	A	24-07-1996	AU 701544 B2	28-01-1999
			AU 4059795 A	27-06-1996
			CA 2164167 A1	21-06-1996
			EP 0723156 A2	24-07-1996
			JP 8233817 A	13-09-1996
WO 0171353	A	27-09-2001	WO 0171353 A1	27-09-2001